

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 197 35 119 A 1

51 Int. Cl.⁶:
G 01 N 21/64
G 01 N 21/03

21 Aktenzeichen: 197 35 119.0
22 Anmeldetag: 13. 8. 97
43 Offenlegungstag: 11. 3. 99

DE 197 35 119 A 1

71 Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

74 Vertreter:
Patentanwaltskanzlei Liermann - Castell, 52355
Düren

72 Erfinder:
Tewes, Michael, Dipl.-Phys. Dr., 69115 Heidelberg,
DE; Langowski, Jörg, Prof. Dipl.-Biochem. Dr.,
69120 Heidelberg, DE

56 Entgegenhaltungen:
DE 27 10 030 A1
tm-Technisches Messen, 63, 1996, S. 128-135;
SCHRÖDER, G.: Technische Optik - kurz und bündig,
Vogel-Verlag, Würzburg 1974, S. 52 u. 53;
Grimsehl-Lehrbuch der Physik, Bd. 3, 15. Aufl.,
B.G. Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig 1969,
S. 39-41;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verfahren und Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie,
Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

57 Bei dem Verfahren fallen die Lichtstrahlen parallel in
das transparente Medium ein und werden innerhalb des
transparenten Mediums zu einem Fokus hin abgelenkt.
Dadurch wird die Verwendung refraktiver Optik vermie-
den. Die fokussierende erfindungsgemäße Optik erlaubt
die Bündelung von Lichtstrahlen unterschiedlicher Wel-
lenlängen auf einen Punkt innerhalb der Probe.
Dadurch wird der Aufbau und die Justierung einer Mehr-
farben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Vor-
richtung deutlich vereinfacht.

DE 197 35 119 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, bei dem Lichtstrahlen in einem transparenten Medium fokussiert werden.

Bei der Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) werden molekulare Wechselwirkungen untersucht, indem man zwei Reaktionspartner mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und sie in einem flüssigen, transparenten Medium frei diffundieren läßt. Die Reaktionspartner erzeugen bei der Diffusion durch den Fokus Fluktuationen der Fluoreszenzintensität, die mit einer konfokalen Optik detektiert werden können. Detektiert man überwiegend korrelierte Intensitätsfluktuationen zwischen den Emissionswellenlängen der beiden Fluorophore, so deutet dies auf eine Komplexbildung zwischen den beiden Partnern hin.

Wegen der unterschiedlichen Anregungswellenlängen der Fluorophore müssen zwei Laserwellenlängen verwendet werden, die auf ein identisches, möglichst kleines Volumen in der Probe fokussiert werden. Hierzu werden in der Regel Mikroskopobjektive mit hoher numerischer Apertur, d. h. großem Öffnungswinkel verwendet, um einerseits einen möglichst kleinen Fokus zu erzielen und andererseits einen möglichst großen Teil des emittierten Lichts einzusammeln und auf dem Detektor abzubilden.

Bei den verfügbaren Objektiven mit hoher numerischer Apertur ist es jedoch nicht möglich, die Brennpunkte für die unterschiedlichen Wellenlängen vollständig zur Deckung zu bringen. Obwohl die Objektive hoch optimiert sind, ist dies aufgrund der chromatischen Fehler nicht für alle Wellenlängen gleichzeitig möglich. Die bekannten Objektive sind daher für die Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie nicht brauchbar.

Ein weiterer Nachteil der verfügbaren Objektive liegt darin, daß ein optimaler, beugungsbegrenzter Fokus nur gewährleistet ist, wenn der Brechungsindex des Immersionsmediums und der Probelösung dem Wert entsprechen, für den das Objektiv optimiert wurde. Da die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sehr empfindlich auf Änderungen des Fokusvolumens reagiert, kann eine Änderung des Brechungsindex die Ergebnisse stark beeinträchtigen. Ursachen für die Änderungen des Brechungsindex sind zum Beispiel Temperaturänderung der Probe oder im Puffer gelöste Salze und somit Parameter, die standardmäßig in biochemischen Experimenten variiert werden. Dieses Problem tritt auch schon bei der Einfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie auf.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren und eine Vorrichtung zu entwickeln, die die beschriebenen Nachteile nicht aufweisen.

Diese Aufgabe wird verfahrensmäßig durch ein gattungsgemäßes Verfahren gelöst, bei dem die Lichtstrahlen senkrecht in das transparente Medium einfallen und erst innerhalb des transparenten Mediums zum Fokus hin abgelenkt werden.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß die bekannten Fehler auf der Verwendung von refraktiver Optik basieren. Einfallswinkel und Ausfallwinkel an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien sind über das Snellius-Gesetz durch deren Brechungsindizes miteinander verknüpft. Ändern sich die Brechungsindizes aufgrund von Dispersion, d. h. einer Änderung des Brechungsindex mit der Wellenlänge, oder durch Verwendung anderer Puffer, so ändert sich auch der Strahlengang und damit das Fokusvolumen. Diese Problematik betrifft jeden Strahlengang mit Ausnahme der

auf die Grenzfläche senkrecht einfallenden Lichtstrahlen. Nur der auf die Grenzfläche senkrecht einstrahlende Lichtstrahl passiert die Grenzfläche unabhängig von den Brechungsindizes ohne Ablenkung.

Diese Erkenntnis führte dazu, daß zur Lösung der Aufgabe in der fokussierenden Anordnung nur reflektive Optik verwendet wurde, und daß sämtliche Lichtstrahlen die Grenzflächen zwischen unterschiedlichen optischen Medien nur senkrecht durchdringen.

Das beschriebene Verfahren erlaubt somit eine einfache Optimierung des verwendeten Objektivs und ermöglicht es, Laserstrahlen mit unterschiedlichen Wellenlängen auf ein identisches, möglichst beugungsbegrenztes Volumen innerhalb der Probe zu fokussieren.

Vorrichtungsmäßig wird die Aufgabe mit einer gattungsgemäßen Vorrichtung gelöst, bei der das Probegefäß einen fokussierenden, verspiegelten Boden aufweist.

Diese Vorrichtung erlaubt es, das Probegefäß als fokussierendes Element zu verwenden. Die in das Probegefäß parallel einfallenden Lichtstrahlen werden durch dessen Boden auf einen Punkt fokussiert. Da dieser Punkt innerhalb des Probegefäßes liegt, entsteht keine weitere Ablenkung der parallel einfallenden Lichtstrahlen an den Grenzflächen zwischen zwei Medien. Die Lichtstrahlen müssen nur einmal in die Probe gelangen und da hier parallel einfallende Lichtstrahlen verwendet werden, werden diese beim Durchdringen des Deckglases oder des Übergangs zwischen Deckglas und Probenflüssigkeit nicht abgelenkt. Während der Ablenkung innerhalb der transparenten Probe müssen keine Grenzflächen zwischen unterschiedlichen Medien überwunden werden.

Eine optimale Bodenform wird dadurch erreicht, daß der Boden parabolisch oder leicht elliptisch geformt ist.

Um ein gutes Meßergebnis zu erzielen wird vorgeschlagen, daß der Boden auf einen Bruchteil der verwendeten Wellenlänge genau gefertigt ist. Die hohe, mit der Vorrichtung erzielbare Präzision fordert auch eine genaue Ausbildung der verspiegelten Bodenfläche.

Um eine langfristige Haltbarkeit der Verspiegelung zu gewährleisten, wird weiterhin vorgeschlagen, daß der Boden mit einer gegenüber üblichen Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt ist.

Ein Ausführungsbeispiel der erfindungsgemäßen Vorrichtung in Gegenüberstellung zu einer bekannten Vorrichtung ist in der Zeichnung dargestellt und wird im folgenden näher erläutert.

Es zeigt:

Fig. 1 eine schematische Darstellung einer bekannten Vorrichtung zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.

Die in **Fig. 1** gezeigte Vorrichtung 1 aus dem Stand der Technik besteht aus einer Küvette 2, die auf einem Deckglas 3 steht und in der sich die Probe 4 in Pufferlösung befindet. Unterhalb des Deckglases 3 befindet sich die letzte Linse 5 eines Objektivs und zwischen dieser letzten Linse 5 und dem Deckglas 3 befindet sich Immersionsflüssigkeit 6.

Parallele Lichtstrahlen 7, 8, 9, 10 gelangen somit durch das Objektiv 5 in die Immersionsflüssigkeit 6 und gehen weiter durch das Deckglas 3 in die in der Küvette 2 befindliche Pufferlösung 4, wo sie sich in einem Fokus 11 bzw. 12 treffen.

Die unterschiedlichen Wellenlängen der Lichtstrahlen 7, 8 bzw. 9, 10 führen dazu, daß die Strahlen an jeder Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlich abgelenkt werden und sich somit in verschiedenen Foki 11 bzw. 12 treffen.

3

Um so größer der Abstand 13 zwischen dem Fokus 11 und dem Fokus 12 ist, um so größer ist die Beeinträchtigung der Messung.

Die beschriebene Vorrichtung zeigt, daß die Lichtstrahlen 7, 8, 9, 10 von Lasern mit unterschiedlichen Laserwellenlängen mehrere Grenzflächen passieren müssen, bis sie sich in einem der Wellenlänge des jeweiligen Lichtstrahls entsprechenden Fokus 11 bzw. 12 treffen. Diese Übergänge führen zu einer starken Beeinträchtigung der Messung.

Die in Fig. 2 gezeigte Vorrichtung 20 besteht aus einem Block 21 mit einer planen Oberfläche 22 in die eine Vertiefung 23 als Probegefäß eingearbeitet ist. Dieses Probegefäß hat im Querschnitt die Form einer Parabel und eine verspiegelte Bodenfläche 24, die als Parabolspiegel wirkt. Dieser Parabolspiegel ist so ausgelegt, daß sich der Fokus 25 von parallel einfallenden Lichtstrahlen innerhalb der Vertiefung 23 befindet.

Oberhalb der Vertiefung 23 ist auf die plane Oberfläche 22 des Blocks 21 ein Deckglas 26 aufgelegt, das die mit Probe in Pufferlösung angefüllte Vertiefung 23 abdeckt.

Um die Fokussierung im Punkt 25 zu optimieren, ist der Boden 24 auf einen Bruchteil der Wellenlängen der verwendeten Lichtstrahlen genau gefertigt und das spiegelnde Material ist so auf die Pufferlösungen abgestimmt, daß eine Veränderung des Materials durch die Pufferlösungen oder die Probe unterbleibt.

Bei der Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung 20 wird zunächst die Probe mit einer Pufferlösung in die Vertiefung des Blocks 21 gegeben. Die vollständig gefüllte Vertiefung 23 wird anschließend mit dem Deckglas 26 abgedeckt. Dies hat zur Folge, daß parallel einfallende Lichtstrahlen 27, 28, 29, 30, 31, 32 senkrecht die Oberfläche des Deckglases durchdringen, in die in der Vertiefung 23 angeordnete Probe eindringen und durch die Probe hindurch bis auf die Bodenfläche 24 gelangen. Da der Lichtstrahl bis hier jede Grenzfläche zwischen zwei Medien (Luft/Deckglas) und (Deckglas/Probe) senkrecht schneidet, wird er nicht abgelenkt. Erst nach Auftreffen auf die verspiegelte Bodenfläche 24 innerhalb der Probe flüssigkeit werden die Lichtstrahlen 27 bis 32 zum Fokus 25 hin abgelenkt. Da diese Reflexion an der Bodenfläche 24 unabhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ist, treffen sich alle Lichtstrahlen 27 bis 32 im Fokus 25, auch wenn die Lichtstrahlen 27 bis 32 verschiedene Wellenlängen aufweisen.

Die Vorrichtung hat somit den Vorteil, daß der parabolisch oder leicht elliptisch geschliffene Spiegel als fokussierendes Element und gleichzeitig als Aufnahme für die Probe dient und somit prinzipiell alle Abbildungsfehler eliminiert werden.

und der Fokus (25) innerhalb der Schale liegt.

4. Vorrichtung nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden (24) parabolisch oder leicht elliptisch geformt ist.

5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden (24) auf einen Bruchteil der verwendeten Wellenlänge der Lichtstrahlen (27 bis 32) genau gefertigt ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Boden (24) mit einer gegen übliche Pufferlösungen resistenten Schicht verspiegelt ist.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

Patentansprüche

1. Verfahren zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie bei dem Lichtstrahlen (27 bis 32) in einem transparenten Medium fokussiert werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Lichtstrahlen (27 bis 32) annähernd senkrecht in das transparente Medium einfallen und erst innerhalb des transparenten Mediums zum Fokus (25) hin abgelenkt werden.

2. Vorrichtung zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, insbesondere zur Mehrfarben-Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, die ein Probegefäß (23) aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß das Probegefäß (23) einen fokussierenden, verspiegelten Boden (24) aufweist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Probegefäß (23) schalenförmig ist

